

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

#4  
ky  
3. Ps2  
11000 U.S. PTO  
09/998196  
12/03/01

Application of: Shen-Chih MAI et al.

Application No.: To Be Assigned

Filed: Concurrently Herewith

For: MONOCLONAL ANTIBODIES  
FOR THE DETECTION OF DECOY  
RECEPTOR 3, HYBRIDOMAS  
PRODUCING SAID ANTIBODIES  
AND USES THEREOF

Group Art Unit: To Be Assigned

Examiner: To Be Assigned

Attorney Docket No.: 6653-016-999

**CLAIM TO PRIORITY**  
**TRANSMITTAL OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT**

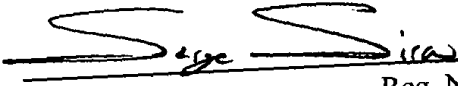
Assistant Commissioner for Patents  
**BOX PATENT APPLICATION**  
Washington, D.C. 20231

Sir:

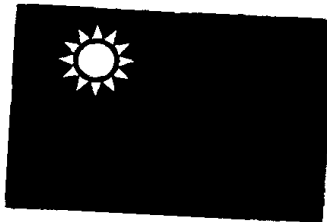
Enclosed please find a certified copy of Republic of China (Taiwan) Application  
Number 089125856 filed December 5, 2000 from which priority has been claimed in this  
application.

Respectfully submitted,

Date December 3, 2001

  
For: Serge Sira  
Marcia H. Sundeen  
PENNIE & EDMONDS LLP  
1667 K Street, N.W.  
Washington, DC 20006  
(202) 496-4400  
Reg. No. 39,445  
Reg. No. 30,893

Enclosure



中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE  
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS  
REPUBLIC OF CHINA



茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，  
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this  
office of the application as originally filed which is identified hereunder：

申請日：西元 2000 年 12 月 05 日  
Application Date

申請案號：089125856  
Application No.

申請人：華星生物科技股份有限公司  
Applicant(s)

局長  
Director General

陳明邦

發文日期：西元 2001 年 10 月 02 日  
Issue Date

發文字號：09011014704  
Serial No.

申請日期：

案號：

類別：

(以上各欄由本局填註)

## 發明專利說明書

一、 發明名稱	中 文	檢測誘捕受體3(Decoy Receptor 3)之單株抗體，產生該抗體之融合瘤及其用途
	英 文	
二、 發明人	姓 名 (中文)	1. 麥勝智 2. 謝世良 3. 劉士任 4. 李匡華
	姓 名 (英文)	1. 2. 3. 4.
	國 籍	1. 中華民國 2. 中華民國 3. 中華民國 4. 中華民國
	住、居所	1. 台北市北投區東華街二段72號4樓 2. 台北市健康路162號10樓 3. 台北縣汐止市工建路114號7樓 4. 台北市石牌路二段201號
三、 申請人	姓 名 (名稱) (中文)	1. 華星生物科技股份有限公司
	姓 名 (名稱) (英文)	1. ANAWRAHTA BIOTECH CO., LTD.
	國 籍	1. 中華民國
	住、居所 (事務所)	1. 台北縣汐止市新台五路一段112號18樓
	代表人 姓 名 (中文)	1. 羅敏菁
	代表人 姓 名 (英文)	1.



四、中文發明摘要 (發明之名稱：檢測誘捕受體3(Decoy Receptor 3)之單株抗體，產生該抗體之融合瘤及其用途)

本發明提供抗誘捕受體3 (DcR3) 之單株抗體，產生該抗體之融合瘤，含此單株抗體之套組，以及利用此融合瘤、抗體及套組檢測誘捕受體3相關性之疾病，以及治療及/或預防誘捕受體3相關性之疾病。

英文發明摘要 (發明之名稱：)



本案已向

國(地區)申請專利

申請日期

案號

主張優先權

無

有關微生物已寄存於

寄存日期

寄存號碼

食品工業發展研究所

2000/10/11

CCRC 960122

食品工業發展研究所

2000/10/11

CCRC 960123



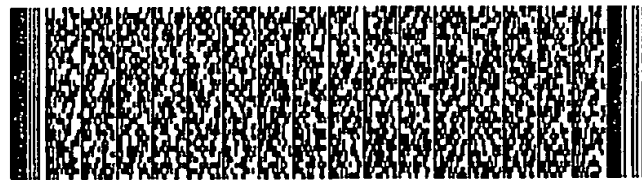
## 五、發明說明 (1)

### 發明領域

本發明係有關於誘捕受體3之單株抗體，產生該抗體之融合瘤，含此單株抗體之套組，以及利用此融合瘤、抗體及套組檢測誘捕受體3相關性之疾病，以及治療及/或預防誘捕受體3相關性之疾病。

### 發明背景

腫瘤壞死因子及其受體 (TNF/TNFR) 家族蛋白在複雜的生物調節體系中扮演極重要的角色，例如，細胞增殖與分化、細胞存活與死亡、細胞激素的產生和免疫細胞的活化等。而在這個家族中，有數個成員和傳達細胞凋亡訊息及調控免疫系統特別有關。目前屬於TNF受體超級家族 (superfamily) 分子中的成員，大部分具有死亡區域 (death domain) 並且能傳遞死亡訊息，這些成員包括 TNFR-1、CD95/Fas/APO-1、DR3/TRAMP/APO-3、DR4/TRAIL-R/APO-2、DR5/TRAIL-R 等。此超級家族在分子結構上有一共同點，即在細胞外部區域含有3到6個重複半胱氨酸 (cysteine) 的區域，且胺基酸序列相當類似。另外，這些死亡受體也以在羧基端帶有一段由約80個胺基酸所組成，具有保留性的死亡區域為特徵 (Yu K.Y., et al. 1999, J. Biol. Chem. 274(20): 13733-13736)。目前已知此段訊息序列對於傳遞死亡訊息是必須且重要的，藉由此段死亡區域活化一連串的原細胞凋亡蛋白酶水解酵素 (pro-apoptotic protease caspase)，使細胞因

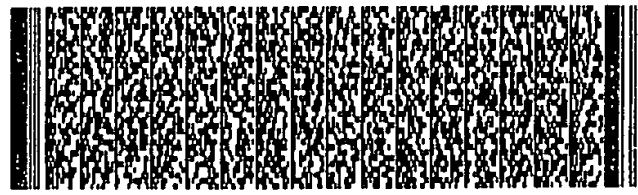
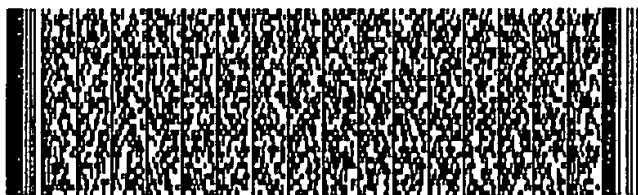


## 五、發明說明 (2)

染色體DNA的瓦解，而帶領細胞走向自然凋亡之路

(Sheikh, MS and Fornace, AJ. Jr., 2000, Leukemia 14: 1509-1513 ; Douglas R. Green, 1998, Nature, 396: 629-630)。

近來Avi Ashkenazi (Nature, 396:699-703, 1998) 等人利用搜尋EST資料庫發現了一新的受體成員，DcR3/TR6，發現誘捕受體3 (Decoy Receptor 3 ; DcR3) 的信使RNA (mRNA) 會特別表現在肺部組織、大腸直腸腺癌和某些內皮細胞株上，在經由PMA/伊諾黴素 (ionomycin) 刺激的Jurkat細胞株上亦會誘發DcR3 mRNA的表現；DcR3有4個富含半胱氨酸的區域，而且它是可溶性蛋白，同時也發現DcR3 會與LIGHT 及FasL/CD95L相結合，並抑制LIGHT 及FasL/CD95L所調節的細胞毒殺作用 (Yu K.Y., et al., supra)。已知LIGHT為HVEM/TR2及LT $\beta$ R之配體 (ligand)，在活化的T細胞及巨噬細胞上有高量的表現；而LIGHT會藉由LT $\beta$ R訊息傳遞造成某些腺癌腫瘤細胞株進行細胞凋亡。此外，細胞自然凋亡在免疫反應中有許多方面皆是藉由FasL-Fas系統來執行，例如，周邊血液系統的細胞刪除 (peripheral clonal deletion)、株落擴張 (clonal expansion) 的控制及毒殺性T細胞活性的調節等，都是藉由Fas及其配體FasL所共同調節的。Robert M. Pitti, et al. 研究發現 (Nature, 396: 699-702, 1998)，DcR3會與Fas相互競爭與FasL的結合，以抑制FasL所傳遞的死亡訊息，因此推論體內某些腫瘤細



### 五、發明說明 (3)

胞可藉由表現大量DcR3而躲避免疫系統的攻擊。

DcR3的基因首先是由人類的肺癌及直腸癌中被分離出來，並顯示在消化道腫瘤組織內具有表現性。Chang, B. et al. (PNAS, 97(3): 1230-1235, 2000) 曾利用DcR3的片段製備抗體，並以此作為組織免疫染色之檢驗。然而，該篇文獻中僅製備抗DcR3的多株抗體 (polyclonal antibody) 以作為免疫染色之用，並且僅顯示mRNA的表現量，因此，不論是在抗體的專一性 (specificity) 或是檢測的時間、成本上，都不是理想的方法。此外，該文獻中更無具體提出DcR3是否確實存在於血清中，並且也沒有揭示其可應用於臨床診斷疾病的方法。

對於疾病的檢測，特別是與癌症相關的疾病，需要一種快速、有效且準確的方法，才能容易地篩選出癌症前期的病患，早期接受更精密的檢查或進一步的治療。此外，對於一些具有家族病史的高危險族群及癌症預後的病患而言，簡易、方便、快速且準確的檢測方法，可有效地定期追蹤特定的疾病，以達到早期發現早期治療的效用。酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA) 已廣泛應用於各種疾病的檢測，其準確率幾乎是與所發展的抗體成正相關，因此，對於尋找一種可檢驗多樣癌症的標幟蛋白，並發展相關的檢驗套組，有其急迫的需求。

### 發明概述

有鑑於此，本發明的第一形態是提供可對抗誘捕受體





## 五、發明說明 (4)

### 3 之單株抗體。

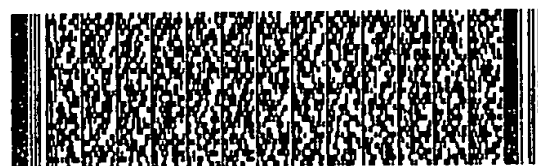
本發明的第二形態是提供可產生該等單株抗體之融合瘤。

本發明的第三形態是提供一種包括誘捕受體3與一免疫球蛋白的恆定區片段之融合蛋白，以及包括此融合蛋白的醫藥組合物。

本發明的第四形態是提供一種檢測誘捕受體3相關性<sup>~~</sup>疾病之套組，包括：(i)一種由融合瘤9A10C3所分泌之專一於抗誘捕受體3之單株抗體，以及另一由融合瘤3H5所分泌之專一於抗誘捕受體3之單株抗體；(ii)一支持工具，其上粘附由融合瘤9A10C3所分泌之專一於抗誘捕受體3之該單株抗體；(iii)一清洗溶液；以及(iv)一訊號產生工具，其可操作性地與由融合瘤3H5所分泌之專一於抗誘捕受體3之該單株抗體連結而產生訊號。

本發明的第五形態是提供一種檢測誘捕受體3含量之方法，包括下列步驟：(a)提供一種由融合瘤9A10C3所分泌之專一於抗誘捕受體3之單株抗體；(b)使該單株抗體粘附在一支持工具上，以形成一抗體-支持物共軛體；(c)使檢測樣品或誘捕受體3標準液與該抗體-支持工具共軛體接觸；(d)以一清洗溶液進行清洗步驟；(e)提供一訊號產生工具，其可操作性地與由融合瘤3H5所分泌之專一於抗誘捕受體3之該單株抗體連結而產生訊號；以及(f)測量該訊號產生工具所產生之訊號。

為了讓本發明之上述和其他目的、特徵，及優點能更



## 五、發明說明 (5)

明顯易懂，下文特舉較佳實施例並配合所附圖示，做詳細說明如下：

### 圖示簡單說明

第1圖係一西方墨漬圖，顯示本發明之融合瘤9A10C3專一性辨識活體外表現的DcR3。

第2圖係顯示本發明之檢測套組之標準定量曲線。

第3圖係顯示以本發明之檢測套組對各種癌症病患之血清樣品進行分析之結果，其中，N代表受測樣品數。

第4圖係顯示以本發明之檢測套組對各種與DcR3有關之非癌症病患的血清樣品進行分析之結果，其中，N代表受測樣品數。

### 發明詳述

有鑑於誘捕受體3（在本說明書的內文中簡稱為DcR3）可能在特定的組織及環境中表現，本發明的發明者因此研發高專一性的抗DcR3單株抗體，並藉此篩選數種疾病（例如，各種癌症、紅斑性狼瘡症、B型肝炎、過敏症及後天性免疫不全症候群），以期能夠發展出可針對與DcR3具有相關性疾病之檢測套組，以提供另一種早期篩選重症疾病的途徑。

本發明利用現有資料庫上的基因序列，從人類胎兒肺部的互補DNA（cDNA）資料庫中，以聚合酶鏈鎖反應（PCR）增殖得到人類DcR3的cDNA片段，然後選殖到含有免疫球

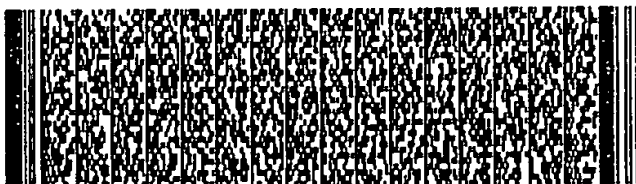


## 五、發明說明 (6)

蛋白恆定區片段 (Fc) 的部份相接，並在適當的宿主細胞中表現DcR3-Fc的融合蛋白。上述選殖的方法是熟悉分子生物學領域之人士所熟知，並將於以下的實施例中詳細說明；其中，將DcR3與恆定區片段融合，除可增加此融合蛋白的溶解度以及表現後的純化回收之外，更可具有類似抗體的性質，以利其他方面的應用。此外，融合蛋白更可與適當的載體賦形成為一醫藥組合物而施用於哺乳動物體內，藉此可與FasL結合，以抑制Fas-FasL結合所傳遞的死亡訊息，因此，本發明所提供之含有此融合蛋白的醫藥組合物，可具有治療及/或預防DcR3相關性疾病之潛力。在一較佳具體實施例中，恆定區片段係得自人類G1型免疫球蛋白 (IgG1 Fc)。

本發明係利用B細胞融合的方式，製得對DcR3具專一性的B細胞融合瘤3H5及9A10C3。其方法為利用習知之細胞融合劑，例如聚乙二醇 (PEG)，將骨髓瘤細胞株與產生對抗DcR3抗體的B淋巴細胞融合，以HAT篩選融合瘤細胞株，再利用ELISA分析融合瘤培養基液中抗體之專一性，再選取對DcR3具專一性之單株融合瘤細胞株。然後將該融合瘤細胞株注入小白鼠腹腔中以生產腹水，利用該單株抗體配製發展出酵素免疫分析試劑，以檢測血液中DcR3的量。本發明所使用的免疫原即上述以基因工程方法製備的DcR3-Fc融合蛋白，其詳細內容如以下實施例所說明。

根據本發明所製備之融合瘤，可分泌製造抗DcR3之單株抗體之輕鏈及重鏈可變區多胜肽，亦即，此融合瘤可分



## 五、發明說明 (7)

泌製造包括專一於DcR3之重鏈可變區多胜肽及輕鏈可變區多胜肽之單株抗體。

本發明提供一種檢測DcR3含量之雙抗體三明治免疫分析法，係將抗DcR3單株抗體（例如，9A10C3）粘附在一支持工具之表面。測試時，將不同標準濃度之DcR3或待測樣品加入上述固定之抗體-支持物共軛體。然後藉由一清洗溶液將未結合的樣品洗去，再加入另一株對抗不同抗原決定部位（epitope）的抗DcR3單株抗體（例如，3H5），其連結一訊號產生工具，可在適當的環境下產生可供判別的訊號。由於抗DcR3單株抗體與DcR3有專一性結合之特性，故藉由已知標準濃度的DcR3所產生訊號強弱所建立之一條訊號標準曲線，可檢測待測血液樣品中DcR3之含量，此外，利用兩株對抗不同抗原決定部位的單株抗體，亦可大幅提升檢測時的精確性。

本發明也包括一種用於檢測DcR3相關性疾病之免疫分析套組，包括(i) 由融合瘤9A10C3及3H5所分泌之專一於DcR3之單株抗體；(ii) 一支持工具，其上粘附由融合瘤9A10C3所分泌之專一於抗DcR3之單株抗體；(iii) 一清洗溶液；以及(iv) 一訊號產生工具，其可操作性地與由融合瘤3H5所分泌之專一於DcR3之單株抗體連結而產生訊號。

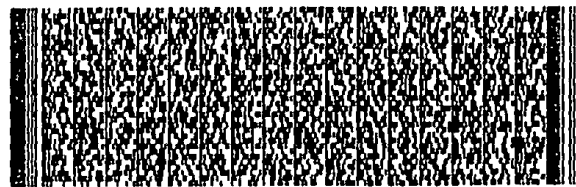
可應用於本發明之適合的支持工具包括微量測試盤（microtiter plate）、微球體（bead）以及由聚乙烯、聚苯乙烯、硝化纖維或耐龍所構成之蛋白質固定材料。可



#### 五、發明說明 (8)

適合用於本發明之清洗溶液包括，但並不限於，磷酸鹽緩衝溶液 (PBS)、三羥甲基胺基甲烷緩衝液 (TBS)，並可視需要添加蛋白酶抑制劑 (例如，苯甲脒 (benzamidine)) 或界面活性劑 (例如，Tween-20、Tween-80 等系列)。訊號產生工具係此技藝中人士所熟知，並可依需要而選擇使用，包括，放射性免疫測試、螢光免疫測試 (例如，鐳系螢光物)、冷光標記物 (例如，生物冷光標記物或化學冷光標記物) 或酵素。其中可使用的酵素包括鹼性磷酸酶 (AP)、過氧化氫酶 (HRP) 或  $\beta$ -半乳糖苷酸酶；使用上述酵素可配合一適當的基質使其反應顯色，基質的選擇可根據所選擇的酵素而定，並且是在此技藝之人士所習知。適合的基質包括對-硝基苯酚磷酸鹽 (pNPP)、2,2'-連氮基-雙-(3-乙基苯-噁唑啉-6-磺酸) (ABTS)、5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸鹽/硝基藍四唑鎓 (BCIP/NBT) 或萘酚 AS-TR 磷酸鹽或 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺 (TMB) 等。免疫分析的方法及反應條件可參見 Antibody: A Laboratory Manual, Ed. Harlow & David Lane, 1988。

在本發明的較佳具體實施例中，檢測 DcR3 相關性疾病之免疫分析套組更可利用生物素 (biotin) 及抗生物素蛋白 (avidin) 的專一性結合，而達到放大訊號及提升準確性之目的。將本發明所提供的單株抗體 (例如，3H5) 與生物素連結，並辨識結合至樣品中的 DcR3，然後加入連結一酵素 (例如，鹼性磷酸酶、過氧化氫酶或  $\beta$ -半乳糖苷酸酶等) 的抗生物素蛋白，再利用適當的基質呈色。藉由



## 五、發明說明 (9)

單株抗體3H5對DcR3的第一次辨識，以及生物素對於抗生物素蛋白的第二次專一結合，不但可放大偵測訊號，並且可大幅降低錯誤率。

可利用本發明所提供之免疫分析套組檢測之DcR3相關性疾病，包括但並不限於，癌症，例如，鼻咽癌、頭頸癌、肺癌、乳癌、結腸癌、移行上皮癌（TCC）、肝癌（HCC）、食道癌、血癌（leukemia）等；或是紅斑性狼瘡、B型肝炎、過敏性疾病（例如，哮喘）、後天性免疫不全症候群（AIDS）等，其結果如下所述。

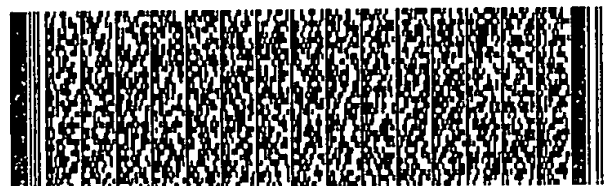
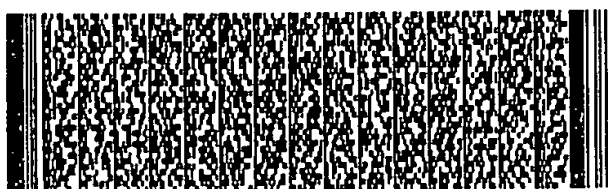
本發明所提供之融合蛋白（DcR3-Fc）、融合瘤、對抗DcR3之單株抗體，除了可應用於上述之檢測套組外，也可應用在其他相關的免疫學領域中，例如，流式細胞分析（flow cytometry）、快速免疫層析法（one-step strip）、西方墨漬法（western blot）、免疫沈澱、免疫螢光染色、組織化學染色、原位標定（in situ labeling）等，都是在本發明的範疇之內。

### 實施例

本發明將藉由以下的實施例而作更進一步地詳細說明，但這些實施例僅是作為舉例說明，而非用以限定本發明之範疇。

#### 實施例1：DcR3-Fc融合蛋白之製備

（A）根據EST cDNA資料庫，從人類胎兒肺部cDNA資料庫



## 五、發明說明 (10)

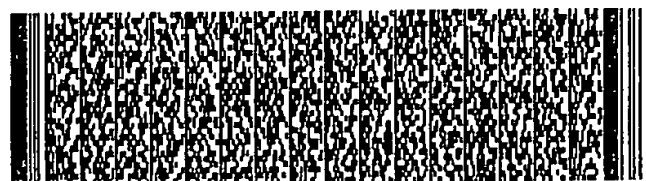
中以PCR法增殖得到人類DcR3的cDNA片段。再將此片段選殖到含有人類G1型免疫球蛋白Fc部份(IgG1 Fc)相接。

### (B) 細胞轉染送入表現載體

首先準備好蛾類幼蟲細胞株Sf21於35毫米培養皿中，經過隔夜培養。將酵素切割成直線型的亞模坡病毒(AcMNPV；購自Clontech Co.)之DNA約100-200奈克(ng)，與含有人類DcR3基因之轉送載體DNA約500-1000奈克，在聚苯乙烯試管中混合，並加入等體積且稀釋1.5倍的力博飛(Lipofectin；購自Gibco Co.)，混合均勻後靜置室溫15分鐘，並將隔夜培養之蛾類幼蟲細胞株Sf21以2毫升不含胎牛血清(FCS)之培養液輕輕洗2次，小心保持其單一細胞層，並加入1毫升不含胎牛血清之培養液，緩緩加入混合好的DNA-力博飛混合液。混合均勻後，置於28℃培養箱中培養5小時或隔夜培養，加入1毫升含10%胎牛血清之培養液，再培養48小時，收集2毫升的培養液，儲存於4℃。

### (C) 查驗是否產生重組病毒

利用PCR，首先量取轉染過細胞之培養液10微升，添加10微克蛋白酶K(proteinase K；Sigma)與10倍清潔劑緩衝液A(包含50 mM KCl、0.45% Tween-20、10 mM Tris-HCl (pH 8.4)、0.1毫克/毫升之甘胺酸緩衝液以及0.45% NP-40®)至總體積100微升，於60℃下作用1小時，將病毒蛋白變性、切割，再於100℃下作用10分鐘使病毒之DNA變性，取5微升進行PCR。



## 五、發明說明 (11)

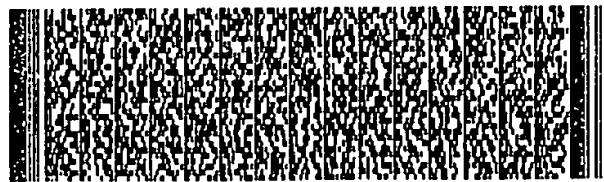
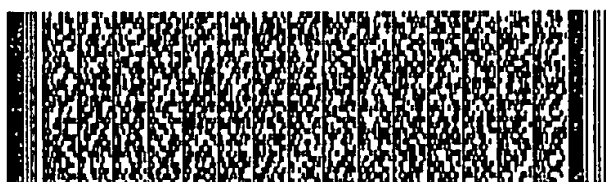
### (D) 病毒斑分析

利用形成病毒斑方式挑送單一病毒株作病毒並定量。首先準備好 $10^6$ 蛾類幼蟲細胞株Sf21在35毫米培養皿中進行隔夜培養。吸出培養液，小心自培養皿中心滴入200微升經培養液稀釋的病毒液( $10^{-2}$ - $10^{-8}$ )，並維持細胞完整的單層結構，培養於28℃下1小時。另外準備好滅過菌的2%低融點洋菜膠溶液，以及含10%胎牛血清培養液，於37℃下將該等溶液以等體積混合，待病毒液完全作用後，吸出病毒液沿培養皿壁慢慢加入2毫升洋菜膠混合液內，在室溫下使其凝固。再加入1毫升含10%胎牛血清之培養液，於28℃下培養5-7天直至病毒斑出現，若要更清楚看到病毒斑，可以在洋菜膠層上加入1毫升以磷酸鹽緩衝液(PBS)配製成的0.025%(w/v)中性紅(Neutral Red; Sigma Co.)溶液，於28℃避光下培養2-4小時，將單層活細胞染上顏色，則病毒斑更容易以肉眼看見。

### (E) 中濃度病毒液之製備

在75平方公分細胞培養瓶中放入 $5 \times 10^6$ 蛾類幼蟲細胞株Sf21，隔夜培養後，吸出培養液並於其中加入1毫升經培養液稀釋的病毒液，於28℃培養1小時，每15分鐘輕輕搖晃一遍。吸出病毒液，加入10毫升培養液在28℃培養4-6天，待細胞產生病毒感染後之細胞病變，收集培養液，儲存於4℃及-70℃下，並以病毒斑分析方式作病毒定量。

### (F) 高濃度病毒液之製備





## 五、發明說明 (12)

將蛾類幼蟲細胞株Sf21在細胞瓶中，自細胞密度 $1 \times 10^5$ /毫升開始懸浮培養至 $5 \times 10^6$ /毫升，以病毒細胞比0.1-0.2加入中濃度病毒液，繼續在 $28^\circ\text{C}$ 培養4-6天收集除去細胞之細胞培養液，經分裝後，存於 $4^\circ\text{C}$ 及 $-70^\circ\text{C}$ ，並以病毒斑分析方式作病毒定量。

### (G) 以懸浮細胞培養作大量蛋白表現

將蛾類幼蟲細胞株Sf21在細胞瓶中，自細胞密度 $1 \times 10^5$ /毫升開始懸浮培養至 $1-2 \times 10^6$ /毫升，以病毒細胞比5-10倍加入病毒液，開始在 $28^\circ\text{C}$ 培養（欲表現大量DcR3）約需4-6天，收集培養液，進行蛋白純化。

### (H) 表現蛋白之純化

經由蛾類幼蟲病毒（Baculovirus）系統作出的人類可溶性DcR3，因有人類G1型免疫球蛋白Fc部份，可經由A蛋白（Protein A）洋菜膠粒（Sephrose CL-4B™）作純化，其製備可參照使用手冊。將融合蛋白純化後，以BCA蛋白分析試劑（PIERCE, Cat. No. 23225）定量。

### 實施例2：產生人類DcR3單株抗體之融合瘤的製備

將50微克總體積0.2毫升的融合蛋白（實施例1），以皮下注射方式打入小鼠（Balb/c）腹或背部皮下，以三星期為一週期，經過4次免疫後，以頸脊脫臼法犧牲小鼠，取出脾臟細胞，以3-5倍脊髓瘤NS-1細胞進行融合。該脾臟細胞以10毫升不含胎牛血清之細胞培養液

##### 五、發明說明 (13)

(RPMI-1640®) 沖下後，靜置於50毫升離心管中。另外量取定量的脊髓瘤NS-1細胞，以10毫升 RPMI-1640® 清洗2次，於室溫下以300 xg 離心5分鐘，再經第三、四次清洗後添加以靜置處理位於上層培養液之脾臟細胞（不含下層其他組織）一起清洗，室溫下以500 xg 離心5分鐘，於倒掉上清液後以殘餘培養液將細胞重新懸浮。加入1毫升37℃的聚乙二醇-1500，再持續轉動試管1分鐘，再加入2毫升 RPMI-1640®，於2分鐘之內加入8毫升前述之培養液，持續轉動試管，最後以300 xg 離心10分鐘，傾倒上清液加入含HAT特有之篩選培養液（Boehringer Mannheim Co.），分布到96槽細胞培養盤中，約 $2 \times 10^5$ 脾臟細胞/槽，培養7-10天後，以ELISA偵測有無特定抗體產生。然後以HT特有篩選試劑之培養液（Boehringer Mannheim Co.）取代原培養液，每一次換培養液稀釋2倍，並作該細胞群的限制性稀釋（limiting dilution）。

上述HAT特有之篩選培養試劑，係一種含有次黃嘌呤（hypoxanthine）、胺基蝶翅素（aminopterin）及胸腺核苷（thymidine）之試劑；HT特有篩選試劑，係一種含有次黃嘌呤及胸腺核苷之試劑。

##### 實施例3：篩選分泌人類DcR3單株抗體之融合瘤

將濃度0.5微克/毫升每槽含100微升的純化蛋白，以固定緩衝液（coating buffer）稀釋後，固定於96槽培養盤中（Costar Co.）。於4℃下反應16小時後，經由含

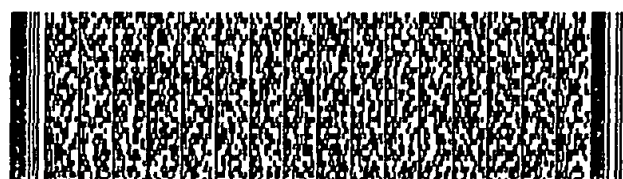
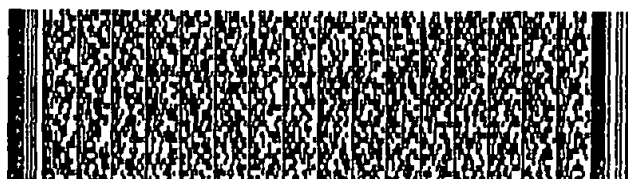


#### 五、發明說明 (14)

0.05 % Tween-20 之磷酸鹽緩衝液 (PBST) 處理，每槽以 300 微升沖洗1次後，加入200微升阻斷緩衝液 (blocking buffer)，在室溫下作用1小時，再以PBST洗滌3次，然後加入事先經過細胞融合瘤培養之培養液，於室溫下作用2小時，以PBST洗滌5次。然後，加入2000倍稀釋 (PBST) 之結合有過氧化氫酶 (Zymed Co.) 的山羊抗小鼠G型免疫球蛋白，於室溫下作用1小時。以PBST洗滌5次，加入100<sup>μ</sup>微升酵素基質呈色 (ABTS; Sigma) 溶液，呈色20分後，以OD<sub>415nm</sub> 測量吸光值。由於本發明之人類DcR3之抗體可能抗人類G1型免疫球蛋白Fc部分或是抗人類DcR3的部分，因此以此2種蛋白分別進行ELISA，以篩選出不會辨認人類G1型免疫球蛋白Fc部分但僅可辨認人類DcR3部分之融合瘤。將融合瘤 (於含10 % DMSO及90 % FCS中) 儲存於-80 °C及液態氮中，並可使用標準之哺乳動物細胞培養技術 (含10 % 胎牛血清之 RPMI 1640<sup>®</sup> 補充以200 mM 穀胺鹽胺及50 μM β-巯基乙醇) 予以培養。融合瘤於民國89年10月11日寄存食品工業發展研究所菌種保存及研究中心 (台灣，新竹)，寄存編號分別為融合瘤9A10C3 : CCRC 960123，融合瘤3H5 : CCRC 960122。

#### 實施例4：鑑定人類DcR3單株抗體

免疫沉澱法：能將細胞內人類DcR3免疫沉澱下來之抗體，則為其單株抗體。



## 五、發明說明 (15)

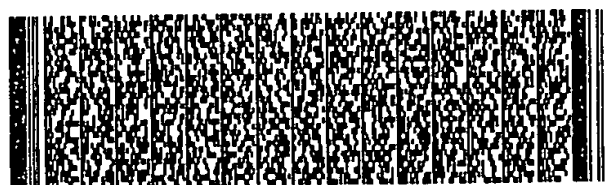
以200微升溶解緩衝液 (lysis buffer) 懸浮 $2 \times 10^6$ 細胞，放置於冰浴下30分以打破細胞，於4℃下以12,000 xg離心除去胞器及細胞殘骸。接著加入5微升的老鼠正常血清，在4℃下以緩慢搖動方式作前清除 (preclear)，處理30分鐘以除去細胞溶質中可與不特定免疫球蛋白結合之蛋白。再加入40微升50% (v/v) A蛋白洋菜膠粒 (Pharmacia Co.) 懸浮液，於4℃下作用1小時令免疫球蛋白沈澱，並於4℃利用500 xg離心3分鐘，留著下沈澱物，以300微升溶解緩衝液重新懸浮，再以500 xg離心3分鐘，除去洋菜膠粒。經過前清除的細胞溶質再於4℃下以A蛋白洋菜膠粒沈澱之單株抗體免疫球蛋白緩慢作用1小時，放置隔夜，離心沈澱洋菜膠粒，並經過清洗，最後以蛋白質樣品溶液懸浮各樣品，於100℃處理5分鐘進行蛋白質電泳。

### 實施例5：檢測DcR3之免疫分析法

#### (A) 抗體附著盤的製備方法

將本發明之單株抗體9A10C3用0.1 M碳酸鹽緩衝液 (pH 9.6) 稀釋至5微克/毫升。取100微升，附著於96孔微量測試盤之每孔表面上，於4℃過夜培養。以0.05% Tween 20/PBS沖洗1次，然後拍乾。每一槽孔中加入200微升的5%脫脂奶粉/PBS，於4℃過夜阻斷。以0.05% Tween 20/PBS洗5次，拍乾後備用。

#### (B) 免疫分析



##### 五、發明說明 (16)

將各種具有與DcR3相關性疾病之病患的待測血清以樣品稀釋液稀釋2倍後，各加100微升於96孔微量測試盤中，同時也分別加入不同濃度之DcR3標準溶液100微升於各槽孔中，並於4℃靜置16小時以上。將槽孔以PBST清洗5次，然後於每槽孔中加入100微升之生物素標記之單株抗體3H5，於室溫下反應2小時，經清洗後，加入鹼性磷酸酶標記的抗生物素蛋白，於室溫下反應1小時，清洗後加入酵素受質pNPP（1毫克/毫升），於室溫靜置呈色30分鐘。藉由判讀機讀取OD<sub>415nm</sub>之吸光值。標準樣品包括0、0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10及20奈克/毫升的DcR3標準溶液，用以繪製標準曲線，結果如第2圖所示。待測樣品的血清包括正常人（對照組），以及患有鼻咽癌、頭頸癌、肺癌、前列腺癌、乳癌、結腸癌、移行上皮癌（包括膀胱、腎臟、輸尿管等泌尿系統方面的癌症）、肝癌、食道癌、血癌、紅斑性狼瘡、B型肝炎、過敏性疾病（哮喘）、後天性免疫不全症候群。測試結果如第3圖及第4圖所示。

為了證明所製備之單株抗體對DcR3之專一性，本發明進行交叉反應。參考第1圖，第1道係對照組（僅含培養基），第2道是表現載體pCR3.1-LMP（TNFR家族之一員），第3道僅含表現載體pCR3.1，第4道是pCR3.1-DcR3。以單株抗體9A10C3偵測，結果顯示，即使是相同家族之成員，本發明之單株抗體仍可專一性地辨認。

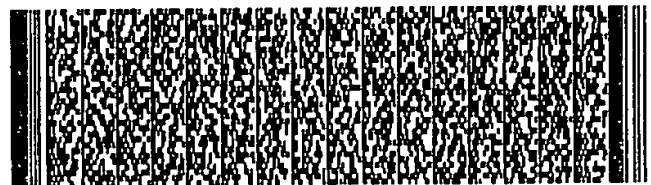
利用3H5與9A10C3兩株單株抗體發展出雙抗體三明治



## 五、發明說明 (17)

法檢驗試劑 (double-antibody sandwich diagnostic kit)，樣品中含有DcR3的濃度愈高，所得的反應愈強 (參見第2圖)，標準曲線亦顯示此套組的靈敏度可達到1奈克/毫升。這樣的雙抗體三明治法檢驗試劑，可用於定量微量的DcR3。由各種癌症患者所得之血清樣品，包括癌症症狀的各種期別，經本發明之套組檢測後 (參見第3圖)，顯示除了前列腺癌之外，其他所測試的癌症，均顯示可偵測到的DcR3濃度。此外，對於非癌症的其他與DcR3有關之疾病，經本發明之套組檢測後 (參見第4圖)，亦顯示可偵測到的DcR3濃度。參考對照組 (正常人之血清，N=30)，其偵測到的DcR3濃度均小於1奈克/毫升，相對地，受測檢體所得到的結果，如果高於3.2奈克/毫升，則可初步判斷為對上述疾病具有陽性的症狀，以便進一步做更精密的檢查。參考第4圖，其中IgE的濃度係以CAP之方式分類，哮喘病患的定義為具有氣管發炎或過敏性氣喘的症狀，其總IgE濃度一般均大於250 kU/L，其中再將其區分為IgE高濃度 (指大於1,000 kU/L) 及IgE低濃度 (指介於250-1,000 kU/L)，而正常人的IgE濃度則通常小於150 kU/L；由實驗數據顯示，無論是IgE高或低濃度的哮喘患者，均可藉由本發明之套組檢測出DcR3濃度。此外，對於後天性免疫不全症候群的病患，目前醫學診斷的指標即在於CD4的計數以及是否帶有HIV-1抗體兩項標記，其中，在帶有HIV-1抗體的病患中，可根據CD4計數再區分為3類：

- (1) CD4計數大於500，為健康帶原者，尚不需投藥；
- (2)

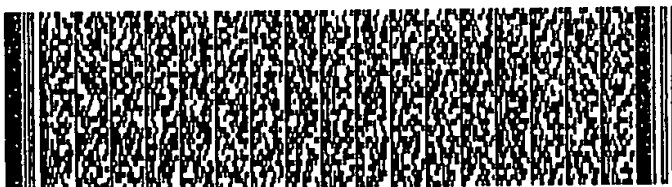


##### 五、發明說明 (18)

CD4 計數介於200-500，需投藥；(3) CD4 計數小於200，則定義為後天性免疫不全症候群病患；由實驗數據顯示，在帶有AIDS抗體的病患中，三種CD4計數的類型均可藉由本發明之套組檢測出DcR3濃度高於正常人。

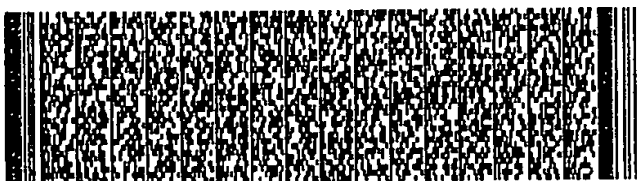
由上述結果顯示，本發明所製備之專一於DcR3的單株抗體及檢測套組，可簡易、方便、快速且準確地定期追蹤與DcR3相關性之疾病，以達到早期發現早期治療的效用。

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟悉此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍，當視後附之申請專利範圍而所界定者為準。



#### 六、申請專利範圍

1. 一種融合瘤3H5，其係產生對抗誘捕受體3 (DcR 3) 之單株抗體。
2. 一種融合瘤9A10C3，其係產生對抗誘捕受體3之單株抗體。
3. 如申請專利範圍第1項及第2項所述之融合瘤，其係骨髓瘤細胞與產生對抗誘捕受體3抗體之B細胞融合之細胞株。
4. 如申請專利範圍第3項所述之融合瘤，其中該B細胞係得自以誘捕受體3與一免疫球蛋白的恆定區片段 (Fc) 融合物免疫之動物。
5. 如申請專利範圍第4項所述之融合瘤，其中該恆定區片段係得自人類G1型免疫球蛋白。
6. 如申請專利範圍第5項所述之融合瘤，可分泌製造對抗誘捕受體3之單株抗體之輕鏈可變區多胜肽。
7. 如申請專利範圍第5項所述之融合瘤，可分泌製造對抗誘捕受體3之單株抗體之重鏈可變區多胜肽。
8. 如申請專利範圍第5項所述之融合瘤，可分泌製造包括對於誘捕受體3具有專一性之重鏈可變區多胜肽及輕鏈可變區多胜肽之單株抗體。
9. 一種融合蛋白，包括誘捕受體3與一免疫球蛋白的恆定區片段。
10. 如申請專利範圍第9項所述之融合蛋白，其中該恆定區片段係得自人類G1型免疫球蛋白。
11. 一種檢測誘捕受體3相關性疾病之套組，包括：





#### 六、申請專利範圍

(i) 一種由融合瘤9A10C3所分泌之對於誘捕受體3具有專一性之單株抗體，以及另一由融合瘤3H5所分泌之對於誘捕受體3具有專一性之單株抗體；

(ii) 一支持工具，其上粘附由融合瘤9A10C3所分泌之對於誘捕受體3具有專一性之該單株抗體；

(iii) 一清洗溶液；以及

(iv) 一訊號產生工具，其可操作性地與由融合瘤3H5所分泌之對於誘捕受體3具有專一性之該單株抗體連結而產生訊號。

12. 如申請專利範圍第11項所述之檢測套組，其中該支持工具包括微量測試盤、微球體以及擇自聚乙烯、聚苯乙烯、硝化纖維及耐龍之蛋白質固定材料所組成的族群中。

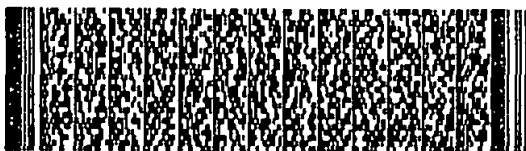
13. 如申請專利範圍第11項所述之檢測套組，其中該清洗溶液包括磷酸鹽緩衝溶液(PBS)或三羥甲基胺基甲烷緩衝液(TBS)。

14. 如申請專利範圍第13項所述之檢測套組，其中該清洗溶液更包括一界面活性劑。

15. 如申請專利範圍第11項所述之檢測套組，其中該訊號產生工具是擇自放射性免疫測試、螢光免疫測試、冷光標記物及酵素所組成的族群中。

16. 如申請專利範圍第15項所述之檢測套組，其中該冷光標記物包括生物冷光標記物或化學冷光標記物。

17. 如申請專利範圍第15項所述之檢測套組，其中該



#### 六、申請專利範圍

酵素係擇自於鹼性磷酸酶、過氧化氫酶及 $\beta$ -半乳糖苷酸酶所組成的族群中。

18. 如申請專利範圍第17項所述之檢測套組，更包括一基質，其中該基質可與該酵素反應而呈色。

19. 如申請專利範圍第15項所述之檢測套組，其中該訊號產生工具更包括生物素。

20. 如申請專利範圍第19項所述之檢測套組，更包括一抗生物素蛋白，其可操作性地與一酵素連結。

21. 如申請專利範圍第20項所述之檢測套組，其中該酵素係擇自於鹼性磷酸酶、過氧化氫酶及 $\beta$ -半乳糖苷酸酶所組成的族群中。

22. 如申請專利範圍第21項所述之檢測套組，更包括一基質，其中該基質可與該酵素反應而呈色。

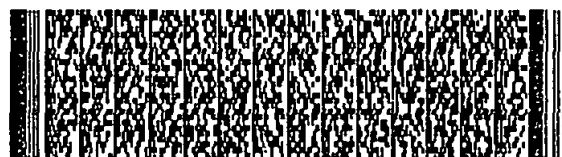
23. 如申請專利範圍第11項所述之檢測套組，其中與誘捕受體3相關性之疾病係擇自鼻咽癌、頭頸癌、肺癌、乳癌、結腸癌、移行上皮癌、肝癌、食道癌、血癌、紅斑性狼瘡、B型肝炎、過敏性疾病及後天性免疫不全症候群所組成的族群中。

24. 一種檢測誘捕受體3含量之方法，包括下列步驟：

(a) 提供一種由融合瘤9A10C3所分泌之對於誘捕受體3具有專一性之單株抗體；

(b) 使該單株抗體粘附在一支持工具上，以形成一抗體-支持物共軛體；

(c) 使檢測樣品或誘捕受體3標準液與與該抗體-支持



## 六、申請專利範圍

工具共軛體接觸；

(d)以一清洗溶液進行清洗步驟；

(e)提供一訊號產生工具，其可操作性地與由融合瘤3H5所分泌之對於誘捕受體3具有專一性之該單株抗體連結而產生訊號；以及

(f)測量該訊號產生工具所產生之訊號。

25. 如申請專利範圍第24項所述之方法，其中該支持工具包括微量測試盤、微球體以及擇自聚乙烯、聚苯乙烯、硝化纖維及耐龍之蛋白質固定材料所組成的族群中。

26. 如申請專利範圍第24項所述之方法，其中該清洗溶液包括磷酸鹽緩衝溶液或三羥甲基胺基甲烷緩衝液。

27. 如申請專利範圍第26項所述之方法，其中該清洗溶液更包括一界面活性劑。

28. 如申請專利範圍第24項所述之方法，其中該訊號產生工具是擇自放射性免疫測試、螢光免疫測試、冷光標記物及酵素所組成的族群中。

29. 如申請專利範圍第28項所述之方法，其中該冷光標記物包括生物冷光標記物或化學冷光標記物。

30. 如申請專利範圍第28項所述之方法，其中該酵素係擇自於鹼性磷酸酶、過氧化氫酶及 $\beta$ -半乳糖苷酸酶所組成的族群中。

31. 如申請專利範圍第30項所述之方法，更包括提供一基質，其中該基質可與該酵素反應而呈色。

32. 如申請專利範圍第24項所述之方法，其中該訊號



## 六、申請專利範圍

產生工具更包括生物素。

33. 如申請專利範圍第32項所述之方法，更包括提供一抗生物素蛋白，其可操作性地與一酵素連結。

34. 如申請專利範圍第33項所述之方法，其中該酵素係擇自於鹼性磷酸酶、過氧化氫酶及 $\beta$ -半乳糖苷酸酶所組成的族群中。

35. 如申請專利範圍第34項所述之方法，更包括提供一基質，其中該基質可與該酵素反應而呈色。

36. 一種偵測體內誘捕受體3含量之方法，該方法係利用根據申請專利範圍第11至23項中任一項之套組檢測血清樣品，以及判讀結果。

37. 一種醫藥組合物，包括：

(i) 一有效量之誘捕受體3與一免疫球蛋白的恆定區片段所組成之融合蛋白；以及

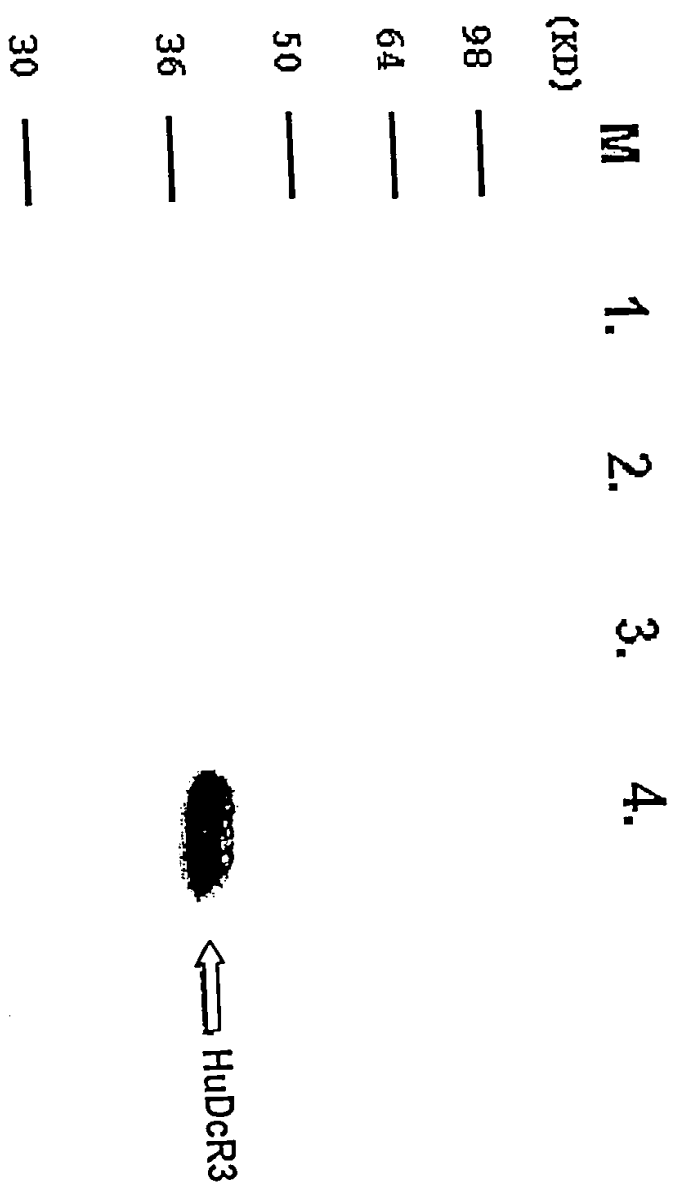
(ii) 一藥學上可接受之載體或賦形劑。

38. 如申請專利範圍第37項所述之醫藥組合物，其中該恆定區片段係得自人類G1型免疫球蛋白。

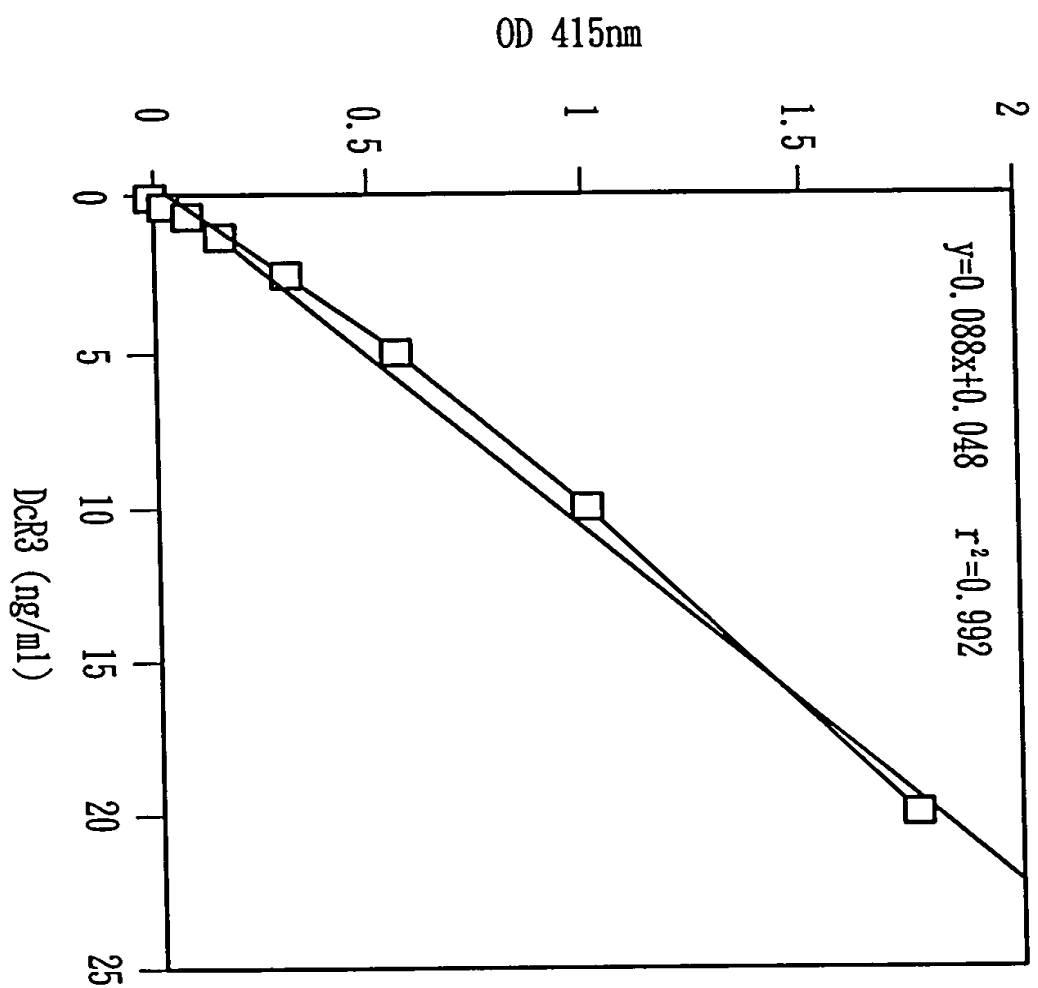
39. 如申請專利範圍第38項所述之醫藥組合物，可用於治療及/或預防誘捕受體3相關性之疾病。

40. 如申請專利範圍第39項所述之醫藥組合物，其中與誘捕受體3相關性之疾病係擇自鼻咽癌、頭頸癌、肺癌、乳癌、結腸癌、移行上皮癌、肝癌、食道癌、血癌、紅斑性狼瘡、B型肝炎、過敏性疾病及後天性免疫不全症候群所組成的族群中。

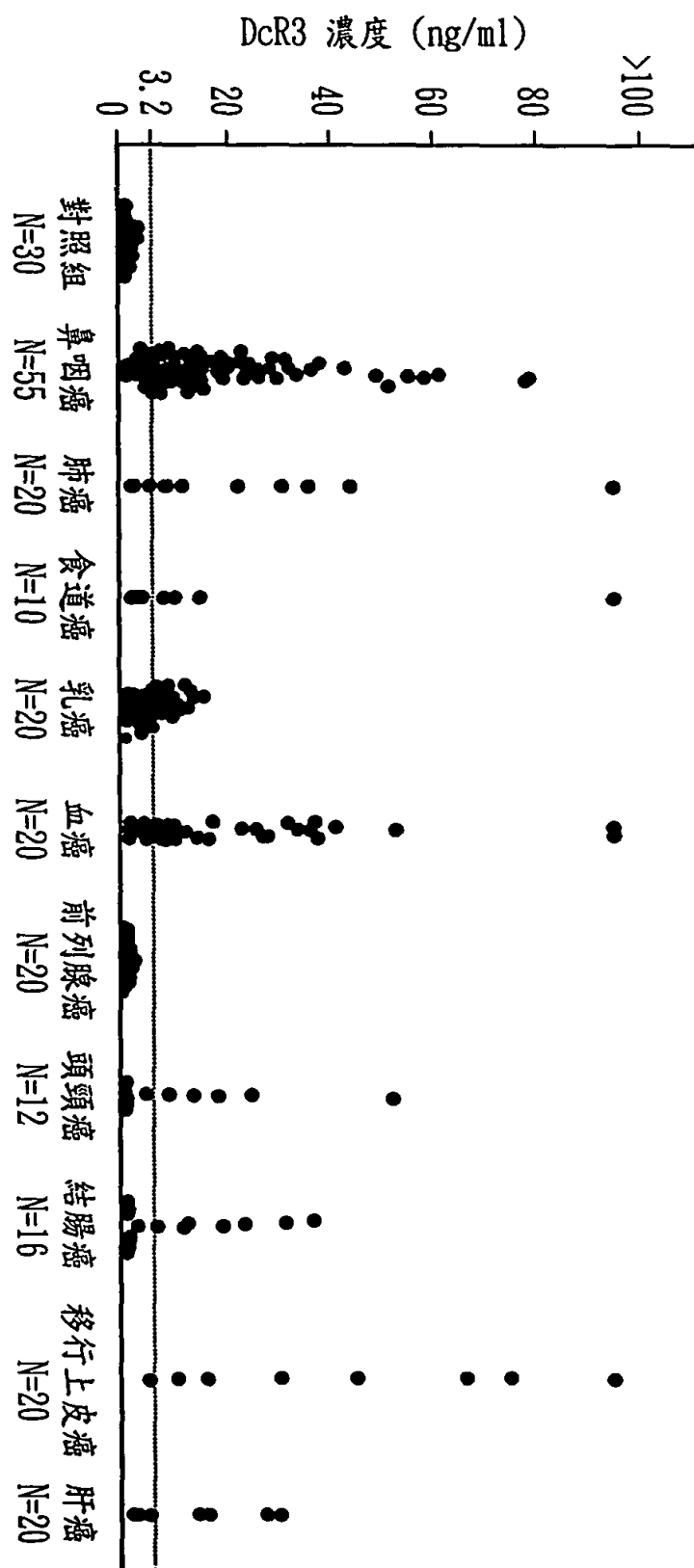




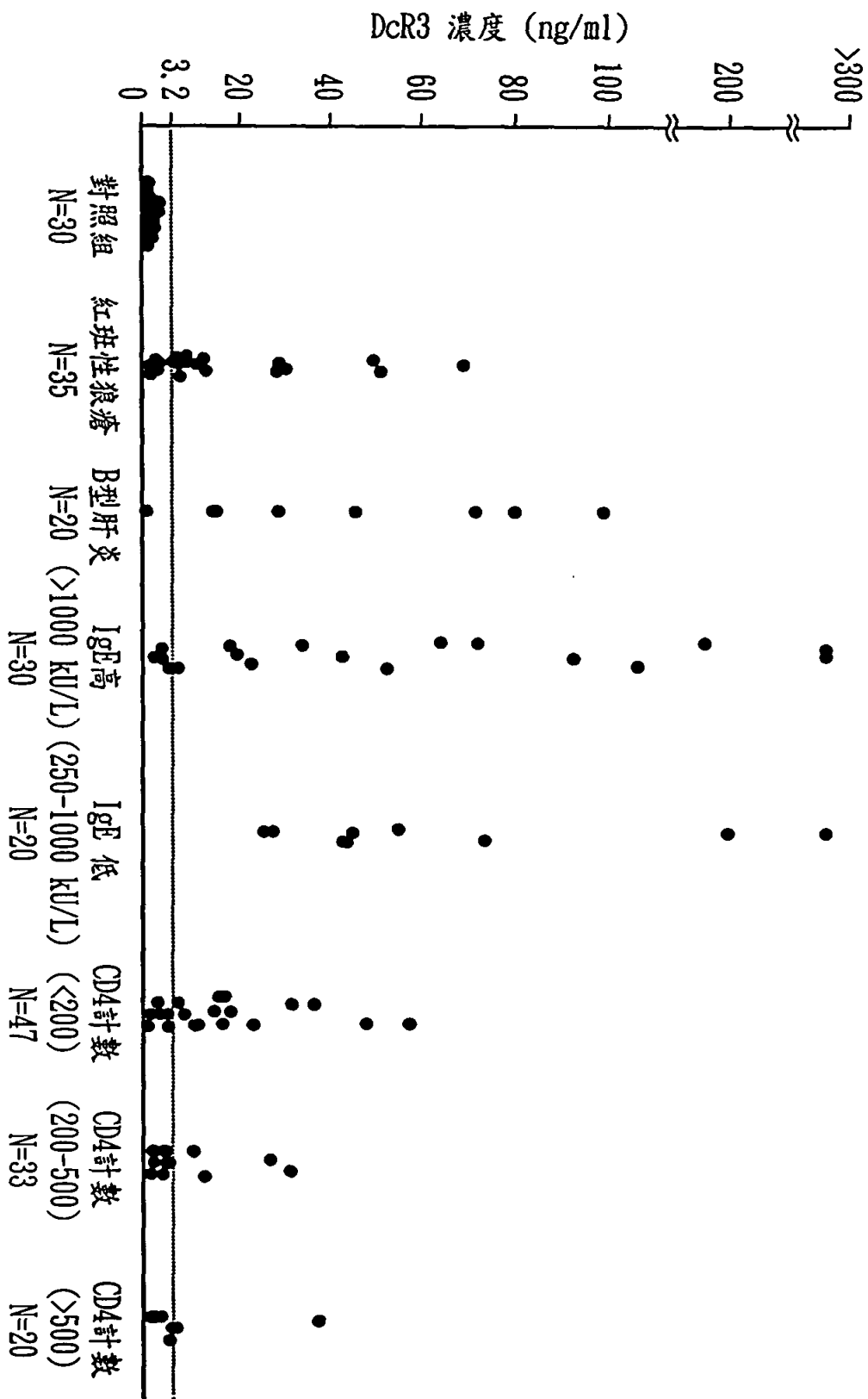
第 1 圖



第 2 圖



第 3 圖



第 4 圖



第 1/26 頁



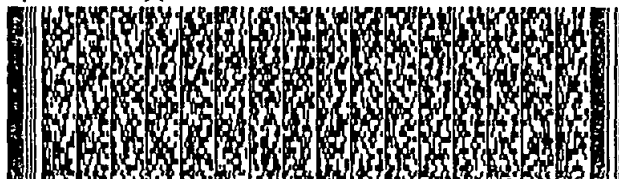
第 2/26 頁



第 3/26 頁



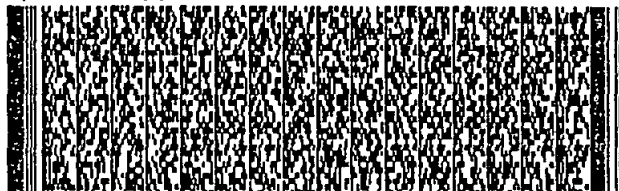
第 4/26 頁



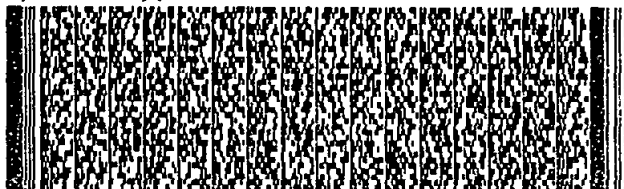
第 4/26 頁



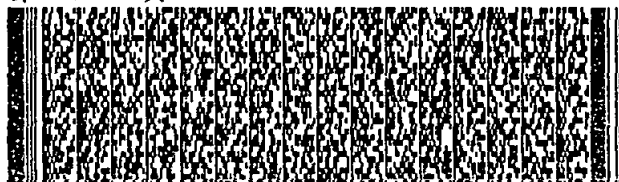
第 5/26 頁



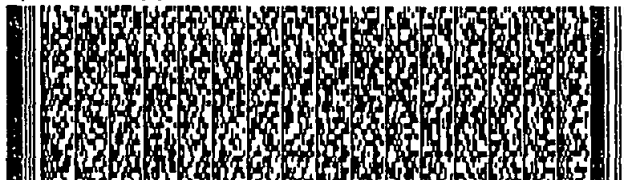
第 5/26 頁



第 6/26 頁



第 6/26 頁



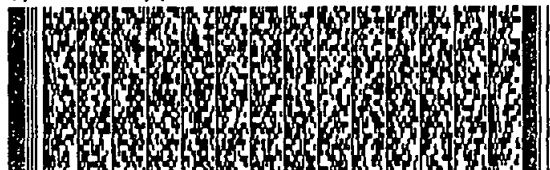
第 7/26 頁



第 7/26 頁



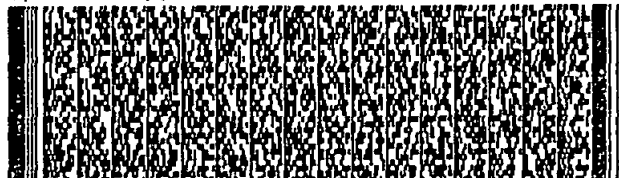
第 8/26 頁



第 8/26 頁



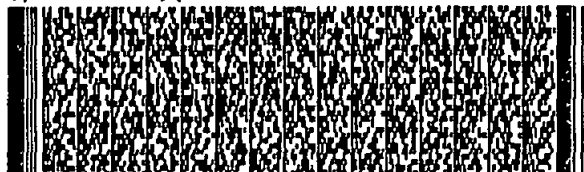
第 9/26 頁



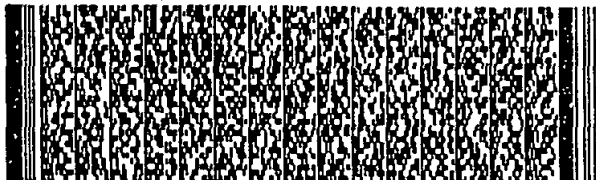
第 9/26 頁



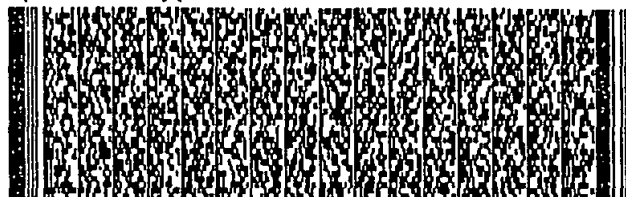
第 10/26 頁



第 10/26 頁



第 11/26 頁



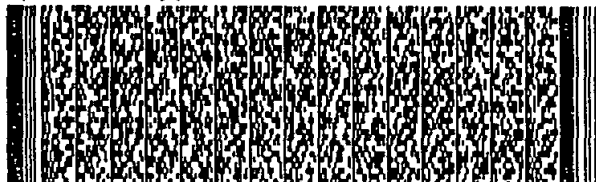
第 11/26 頁



第 12/26 頁



第 12/26 頁



第 13/26 頁



第 13/26 頁



第 14/26 頁



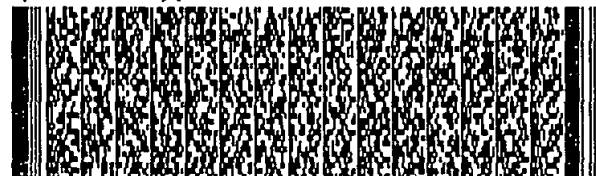
第 14/26 頁



第 15/26 頁



第 15/26 頁



第 16/26 頁



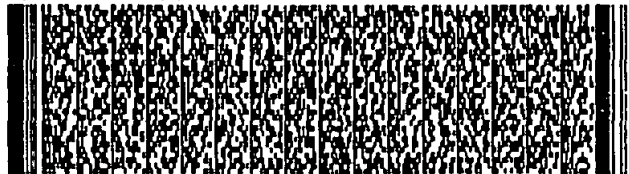
第 16/26 頁



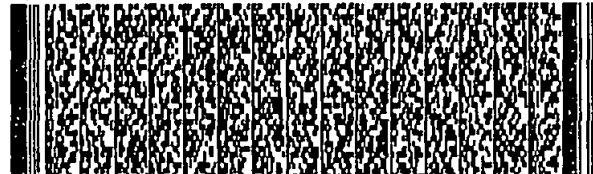
第 17/26 頁



第 17/26 頁



第 18/26 頁



第 18/26 頁



第 19/26 頁



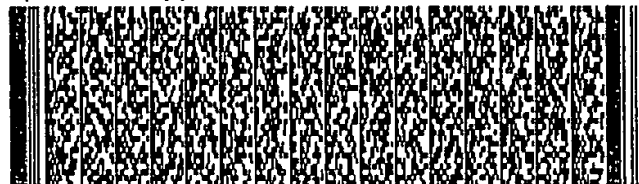
第 19/26 頁



第 20/26 頁



第 20/26 頁



第 21/26 頁



第 22/26 頁



第 23/26 頁



第 23/26 頁



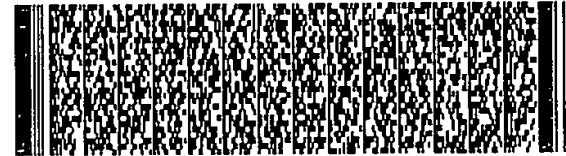
第 24/26 頁



第 24/26 頁



第 25/26 頁



第 25/26 頁



第 26/26 頁



第 26/26 頁

